

بررسی اثر هیپرترمی بعد از تابش نوترون بر فراوانی آسیبهای کروموزومی در لنفوسیت‌های خون محیطی انسان

داریوش فاتحی*، دکتر حسین مزدارانی**

چکیده:

از آنجا که امروزه در درمان سرطانها توجه خاصی به روشهای درمانی مرکب می‌شود در این تحقیق اثر اعمال هیپرترمی بعد از تابش نوترون در فراوانی آسیبهای کروموزومی در لنفوسیت‌های خون محیطی انسان بررسی شد. نمونه‌های خون ابتدا تحت تابش ۱۰ سانی گری (cGy) نوترون قرار گرفتند. سپس با فاصله زمانی یک ساعت به طور جداگانه در درجه حرارت $41/5^{\circ}\text{C}$ به مدت ۶۰ دقیقه یا 43°C به مدت ۳۰ دقیقه واقع شدند. پس از تهیه گسترش و رنگ آمیزی لامها، انواع آسیبهای کروموزومی در مرحله متافاز سلولی شمارش شدند. بررسی نتایج نشان می‌دهد تعداد آسیبهای کروموزومی در نمونه‌هایی که پس از تابش نوترون تحت تأثیر هیپرترمی قرار گرفتند از سایر نمونه‌ها بیشتر است و این افزایش در 43°C چشمگیرتر می‌باشد ($P < 0/05$). مشاهدات نشان می‌دهد اعمال هیپرترمی بعد از تابش باعث افزایش اثر نوترون در ایجاد آسیبهای کروموزومی می‌شود که علت آن اثر مهارکننده هیپرترمی در جلوگیری از ترمیم این آسیبها می‌باشد. به نظر می‌رسد افزایش درجه حرارت سلولها پس از تابش نوترون می‌تواند به عنوان یک روش درمانی مرکب و مناسب در درمان سرطانها مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: هیپرترمی، نوترون، آسیب کروموزومی، لنفوسیت.

مقدمه:

با توجه به این که در مورد روش درمانی مرکب هیپرترمی و رادیوتراپی با پرتوگاما به طور گسترده‌ای کار شده است اما در مورد نوترون و ترکیب آن با هیپرترمی کار زیادی نشده و همچنین با توجه به نتایج ضد و نقیضی که در مطالعات گذشته به دست آمده انجام این تحقیق ضروری به نظر می‌رسد. به عنوان نمونه Overgaard و همکارانش در سال ۱۹۹۱ با مطالعه بر روی سلولهای هیپوکسیک نشان دادند، موقعی که هیپرترمی پس از

وجود سلولهای هیپوکسیک در مرکز توده‌های سرطانی و مقاومت نسبی آنها به پرتوگاما باعث می‌شود در پایان دوره رادیوتراپی تعدادی از آنها زنده مانده و سبب رشد مجدد توده سرطانی شوند. مطالعات نشان می‌دهد استفاده از پرتوهای با قدرت انتقال خطی انرژی (L.E.T) بالا مثل پرتو نوترون و افزایش درجه حرارت (هیپرترمی) سلولهای سرطانی به عنوان یک روش درمانی مرکب باعث بهبود نتیجه درمان خواهد شد (۱).

* عضو هیأت علمی گروه فیزیک پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد: شهرکرد - رحمتیه - دانشکده پزشکی - بخش فیزیک پزشکی - تلفن:

(۲۲۸۳) ۰۳۸۱-۲۳۳۵۶۵۴ (مؤلف مسئول).

** استاد گروه رادیوبیولوژی - دانشگاه تربیت مدرس.

اشعه اعمال شود حساسیت پرتوی این سلولها افزایش می یابد (۱۱).

مطالعه Raaphorst و همکارانش در سال ۱۹۹۴ بر روی دو نوع تومور حساس و مقاوم به اشعه نشان داد که هیپرترمی پس از تابش با جلوگیری از ترمیم آسیبهای DNA باعث ایجاد آسیبهای بیشتری خواهد شد (۱۳). Cai و Jiang در سال ۱۹۹۵ نیز با مطالعه بر روی لنفوسیت های خون محیطی انسان نشان دادند که هیپرترمی قبل از تابش اشعه X باعث ایجاد مقاومت نسبت به اشعه می شود (۲). البته در یک سری از تحقیقات نتایج متناقضی به دست آمده است. از جمله Mittler در سال ۱۹۸۴ نشان داد اعمال هیپرترمی قبل از تابش نوترون باعث افزایش شکستهای کروموزومی می شود و لذا باعث حساس تر شدن سلولها نسبت به اشعه نوترونی می شود (۹).

در تحقیق دیگری که توسط Nevaldine و همکارانش در سال ۱۹۹۴ انجام شد نشان داده شد که هیپرترمی 43°C به مدت ۴۵ دقیقه قبل یا بعد از تابش تأثیر یکسانی در جلوگیری از ترمیم آسیبهای DNA دارد (۱۰).

در تحقیق حاضر اثر هیپرترمی پس از تابش نوترون بررسی شد و سؤال اساسی این است که آیا اعمال هیپرترمی بعد از تابش نوترون باعث افزایش فراوانی آسیبهای کروموزومی خواهد شد یا خیر؟ به عبارت دیگر آیا هیپرترمی باعث حساستر شدن سلولها می شود یا خیر؟ بنابراین هدف از این تحقیق بررسی اثر هیپرترمی بر فراوانی آسیبهای کروموزومی در لنفوسیت هایی است که یک ساعت قبل از هیپرترمی تحت تابش 10 cGy نوترون واقع شده اند.

مواد و روشها:

در این مطالعه نمونه های خون از افراد مذکر سالم، ۲۵-۳۰ ساله و غیر سیگاری که پرتوگیری قبلی

نداشته اند تهیه شد. پس از تهیه خون هیپارینه (5000 واحد در میلی لیتر) حدود 3 ml از آن داخل شیشه های استریل ریخته شد، سپس نمونه ها تحت تابش 10 cGy نوترون قرار گرفتند. برای انجام تابش نوترون از منبع کالیفرنیوم (^{252}Cf) موجود در آزمایشگاه تحقیقات دوزیمتری نوترون و ذرات باردار سازمان انرژی اتمی ایران استفاده شد. قسمت اعظم نوترونهای این چشمه بین انرژیهای ۶-۱۰ میلیون الکترون-ولت (MeV) قرار دارند که جزء نوترونهای سریع محسوب می شوند. تندی دوز نوترون مورد استفاده $1/52\text{ cGy/hr}$ و شعاع تابش $3/5\text{ cm}$ بود.

یک ساعت پس از اتمام تابش، نمونه ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای $41/5^{\circ}\text{C}$ یا 30°C در دمای 43°C درون انکوباتور قرار داده شدند. برای اعمال هیپرترمی از انکوباتور ساخت شرکت شیمی فن استفاده شد و درجه حرارتها هر پنج دقیقه به وسیله یک دماسنج کالیبره با دقت $0/1^{\circ}\text{C}$ کنترل شد. بلافاصله بعد از اتمام هیپرترمی، نمونه ها را به انکوباتور 37°C منتقل کرده و به مدت ۳۰ دقیقه درون آن نگهداری شدند. پس از آن برای تهیه کشت کروموزومی $5/0\text{ ml}$ از این نمونه های خون درون 4 ml محیط کشت RPMI-1640 (ساخت شرکت بهار افشان) ریخته شد و به آن 1 ml سرم جنینی گوساله (Gibco) اضافه شد. سپس مخلوطی از (واحد $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) ۱۰۰ پنی سیلین و ۱۰۰ استرپتومایسین به محیط افزوده شد. برای تحریک سلولها $2/0\text{ ml}$ از عامل میتوزن Phytohemagglutinin (ساخت شرکت بهار افشان) به مخلوط حاضر اضافه شد. شیشه های کشت به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور 37°C نگهداری شدند و سپس با افزودن KCl (با غلظت $0/075\frac{\text{mol}}{\text{lit}}$) به سلولها شوک هیپوتونیک وارد کرده و با استفاده از محلول فیکساتیو تازه (شامل سه حجم الکل متانول و یک حجم اسید استیک خالص) سلولها شستشو داده شدند. پس از انجام این مرحله، چند قطره از محلول

Student t-Test استفاده شد.

نتایج:

در بررسی نتایج در هر دو گروه شاهد اول و دوم هیچگونه شکست کروموزومی مشاهده نشد و میانگین حذف و تبادل کروموزومی و کروماتیدی نیز در بین گروههای شاهد اول و دوم نزدیک به هم بود. در مجموع میانگین کل آسیبها بین دو گروه شاهد اول و دوم اختلاف معنی داری نشان نداد (جدول شماره ۱).

با اعمال هیپرترمی تنها در $41/5^{\circ}\text{C}$ مشاهده شد که میانگین شکافهای کروموزومی در گروههای مختلف اختلاف معنی داری نشان نمی دهد، ولی در درجه حرارت 43°C و زمان ۳۰ دقیقه فراوانی این نوع آسیب از سایر گروهها بیشتر است. میانگین حذف و تبادل کروموزومی نیز در این گروه از سایر گروهها بیشتر است و با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد. حداقل میانگین حذف و تبادل کروماتیدی در گروه $41/5^{\circ}\text{C}$ و ۶۰ دقیقه و حداکثر آن در گروه 43°C و ۳۰

باقیمانده بر روی لامهای سرد پرتاب شد و لامها به مدت ۲۰ دقیقه درون رنگ گیمسای ۵ درصد قرار داده شدند (۶،۵). ناهنجاریهای کروموزومی با استفاده از میکروسکوپ ZIESS در ۱۰۰ متافاز برای هر نمونه بررسی و شمارش شدند. تعداد متافاز بررسی شده در گروههای شاهد اول، شاهد دوم و گروه تابش نوترون هر کدام ۴۰۰ مورد، در گروه هیپرترمی تنها ۳۰۰ مورد و در بقیه گروهها هر کدام ۲۰۰ مورد می باشد. در تمام آزمایشات دو سری نمونه به عنوان شاهد اول و دوم در نظر گرفته شد که بر روی نمونه های شاهد اول هیچگونه تیماری انجام نشده است و شاهد دوم معرف نمونه هایی است که همزمان با کشت نمونه شاهد اول، آنها را درون انکوباتور 37°C گذاشته و پس از پایان مدت زمان تابش نوترون و هیپرترمی بر روی نمونه های دیگر همزمان با آنها از این نمونه شاهد، کشت تهیه شد تا اثر طول مدت زمان و همینطور تغییرات درجه حرارت در حین نقل و انتقال بر روی نمونه ها بررسی شود. برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و

جدول شماره ۱: فراوانی انواع آسیبهای کروماتیدی و کروموزومی در بررسی اثر هیپرترمی بعد از تابش 10cGy نوترون

کل آسیبها	حذف و تبادلات کروماتیدی	شکافهای کروماتیدی	حذف و تبادلات کروموزومی	شکافهای کروموزومی	تیمار
$1/75 \pm 0/27$	$0/5 \pm 0/28$	$0/25 \pm 0/25$	$1 \pm 0/4$	۰	شاهد اول
$2 \pm 0/2$	$0/5 \pm 0/28$	۰	$1/5 \pm 0/28$	۰	شاهد دوم
$2/66 \pm 0/6$	۰	$0/66 \pm 0/33$	2 ± 1	۰	$41/5^{\circ}\text{C}$: ۶۰ min
$11 \pm 1/5$	$0/66 \pm 0/33$	$1/67 \pm 0/33$	8 ± 1	$0/67 \pm 0/33$	43°C : ۳۰ min
$19 \pm 0/4$	$2/25 \pm 0/75$	$2/5 \pm 0/95$	$12/25 \pm 0/7$	$2 \pm 0/4$	10cGy
$26/5 \pm 3/5$	$5/5 \pm 3/5$	$0/5 \pm 0/5$	19 ± 1	$1/5 \pm 0/5$	10cGy , $41/5^{\circ}\text{C}$: ۶۰ min
$29/5 \pm 3/5$	4 ± 1	4 ± 1	18 ± 1	$3/5 \pm 1/5$	10cGy , 43°C : ۳۰ min

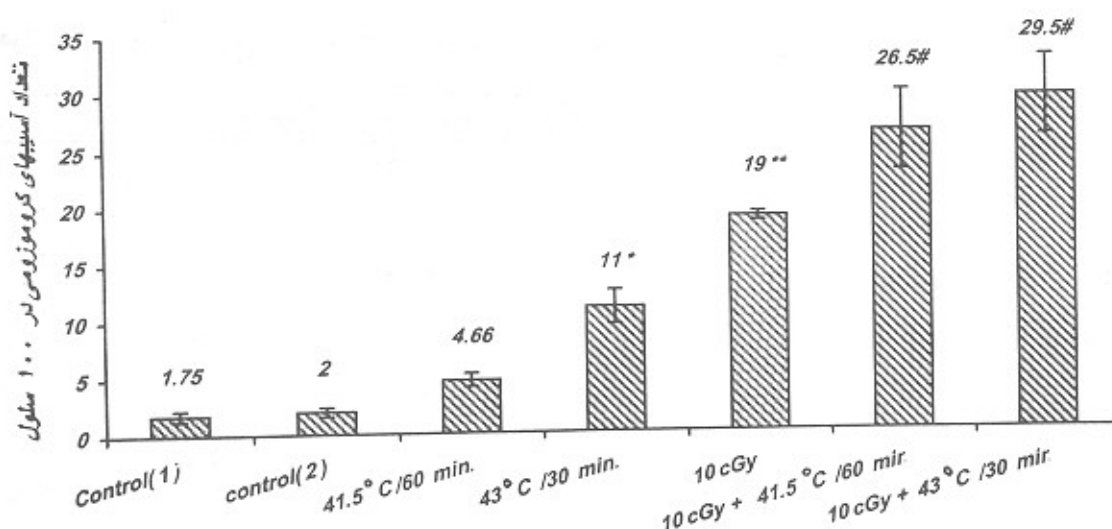
داده ها به صورت میانگین $\pm s.e.m$ می باشد.

* میانگین این نوع آسیب در این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0/05$).
 ** میانگین این نوع آسیبها در این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0/01$).
 *** میانگین کل آسیبها در این گروه با سایر گروهها اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0/05$).

شده با هیپرترمی بعد از تابش، از سایر گروهها بیشتر است و بیشترین میزان این نوع آسیب در گروهی است که پس از دریافت ۱۰ cGy نوترون، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۳°C واقع شدند. بررسیهای آماری نیز بین این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0/05$). فراوانی میانگین آسیبهای از نوع حذف و تبادل کروموزومی نیز در این گروه از سایر گروهها بیشتر است و با گروههای شاهد و هیپرترمی تنها اختلاف معنی داری نشان می دهد ($P < 0/01$) (جدول شماره ۱). با توجه به نتایج به دست آمده مشاهده می شود ماکزیم شکافهای کروماتیدی در گروهی است که ابتدا تحت تابش نوترون بوده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت ۴۳°C قرار گرفتند. بررسیهای آماری نیز بین این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی داری نشان می دهد ($P < 0/01$) (جدول شماره ۱). در مجموع حداکثر فراوانی کل آسیبها در گروه ۴۳°C و ۳۰ دقیقه پس از تابش نوترون می باشد که نسبت به سایر گروهها اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0/05$) (نمودار شماره ۱).

دقیقه مشاهده شد. مقایسه آماری بین گروههای مختلف اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد (جدول شماره ۱). در مجموع فراوانی کل آسیبهای کروموزومی برای شاهد اول در حداقل و برای گروه تیمار شده با هیپرترمی ۴۳°C در مدت ۳۰ دقیقه در حداکثر می باشد. بررسیهای آماری نیز بین این دو گروه اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0/05$) (نمودار شماره ۱). بررسی نتایج در نمونه هایی که فقط تحت تابش ۱۰ cGy نوترون بودند نشان می دهد میزان شکافهای کروموزومی و کروماتیدی و آسیبهای از نوع حذف و تبادل کروموزومی و کروماتیدی در گروههای تابش دیده نسبت به گروههای شاهد اختلاف معنی دار دارند ($P < 0/05$) (جدول شماره ۱). در مجموع فراوانی کل آسیبهای کروموزومی برای گروه شاهد اول در حداقل و برای گروه تابش دیده با ۱۰ cGy نوترون در حداکثر می باشد. بررسیهای آماری نیز اختلاف معنی داری را بین این دو گروه نشان می دهد ($P < 0/01$) (نمودار شماره ۱).

در بررسی اثر هیپرترمی پس از تابش نوترون مشاهده می شود میانگین شکافهای کروموزومی در گروههای تیمار



نمودار شماره ۱: فراوانی مجموع آسیبهای کروموزومی در بررسی اثر هیپرترمی بعد از تابش ۱۰ cGy نوترون.
 * میانگین کل آسیبها در این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0/05$).
 ** میانگین کل آسیبها در این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0/01$).
 # میانگین کل آسیبها در این گروه با سایر گروهها اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0/05$).

بحث:

همان طور که در جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۱ مشاهده می شود تابش دوزهای کم نوترون باعث ایجاد آسیبهای کروموزومی در لنفوسیت های خون محیطی انسان می شود. بررسیهای آماری بر روی میزان فراوانی کل آسیبها بین گروههای تابش دیده و شاهد اختلاف معنی داری نشان می دهد ($P < 0.05$). بیشترین میزان آسیبها با تابش نوترون از نوع تبادل کروموزومی بود.

این نتیجه با نتایج تحقیقات بسیار گسترده ای که در این زمینه انجام شده است همخوانی دارد. از جمله Maurizot و همکارانش در سال ۱۹۹۰ با تابش نوترونهای سریع بر روی DNA پلاسמיד PBR322 نشان دادند که یک رابطه خطی بین ایجاد آسیبهای dsb (double-strand break) و دوز نوترون وجود دارد (۷). Szeinfeld و همکارانش در سال ۱۹۹۲ با مطالعه تومورهای CaNT موش که به طور مصنوعی هیپوکسیک شده و سپس تحت تابش نوترون قرار گرفته بودند تغییرات قابل ملاحظه ای در فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز پیدا کردند (۱۴). این نتایج نشان می دهد که نوترون هم در شرایط *In vitro* و هم در شرایط *In vivo* باعث ایجاد تغییرات قابل ملاحظه ای خواهد شد.

همانطور که در جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۱ نشان داده شد و با توجه به بررسیهای آماری انجام شده، مشاهده می شود که میانگین کل آسیبهای کروموزومی در اثر هیپرترمی تنها در درجه حرارت $41/5^{\circ}\text{C}$ با نمونه های شاهد اختلاف معنی داری ندارند. لذا می توان نتیجه گرفت که هیپرترمی در درجه حرارت های کمتر از $41/5^{\circ}\text{C}$ قادر به ایجاد آسیبهای کروموزومی نمی باشد.

این نتیجه با نتایج تحقیقات Obe و Weissenborn در سالهای ۱۹۹۱ و ۱۹۹۲ مطابقت دارد. آنها با مطالعه اثرات حرارت در فازهای مختلف سیکل سلولی نتیجه گرفتند که حرارت به تنهایی در هیچ مرحله ای از سیکل

سلولی باعث ایجاد آسیبهای کروموزومی نمی شود (۱۷،۱۶).

دماهای بالاتر از 42°C باعث ایجاد آسیب DNA می شوند. در تحقیقی که Birnboim و Mitchel در سال ۱۹۸۵ با مطالعه بر روی لنفوسیت های خون محیطی انسان انجام دادند، نشان داده شد موقعی که درجه حرارت 42°C تا 46°C اعمال شود در زنجیره DNA شکست ایجاد خواهد شد که باعث ناهنجاریهای کروموزومی می شود (۸). در تحقیق حاضر نیز در دمای 43°C و زمان ۳۰ دقیقه تعداد آسیبهای کروموزومی ایجاد شده با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$)، که بیانگر این است که اعمال این درجه حرارت بر روی لنفوسیتها باعث ایجاد آسیبهای کروموزومی می شود. اما این نتیجه با نتایج تحقیقات Obe و Weissenborn متفاوت می باشد. آنها نتیجه گرفتند هیپرترمی حتی در دمای 45°C به مدت ۱۵ دقیقه باعث ایجاد آسیب کروموزومی نخواهد شد (۱۷،۱۶).

Raaphorst در سال ۱۹۹۰ مهم ترین عامل تخریب سیستمهای بیولوژیکی در اثر حرارت را غیر فعال شدن پروتئینها و آنزیمها و همچنین جلوگیری از ساخته شدن RNA و DNA در نتیجه عدم فعالیت آنزیمهای مؤثر در سنتز عنوان کرد (۱۲). در بررسی اثر هیپرترمی پس از تابش نوترون با توجه به جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۱ و بررسیهای آماری، مشاهده می شود در گروههایی که هیپرترمی پس از تابش اعمال شده است میزان فراوانی ناهنجاریهای کروموزومی از سایر گروهها بیشتر است. این نتیجه با نتایج تحقیقات Dikomey در سال ۱۹۸۲ موافق است. ایشان با مطالعه بر روی سلولهای CHO نشان داد اگر هیپرترمی در درجه حرارت های $42-45^{\circ}\text{C}$ پس از تابش اشعه اعمال شود باعث جلوگیری از ترمیم ssb (Single-strand break) شده و لذا تعداد آسیبها بیشتر خواهد شد (۴).

هیپرترمی پس از تابش اشعه باعث افزایش ناهنجاریهای کروموزومی می شود و نتیجه گرفتند که این عمل احتمالاً به علت جمع شدن پروتئینهای غیر هیستونی در هسته سلولها می باشد و باعث غیر فعال شدن آنزیمهای ترمیم کننده DNA و مهار عمل آنها می شود (۱۵). نتایج و مشاهدات نشان می دهد اعمال هیپرترمی بعد از تابش دوزهای کم نوترون می تواند روش مناسبی برای از بین بردن سلولهای سرطانی باشد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله نویسنده از زحمات و راهنماییهای ارزنده آقای دکتر حسین مزدارانی و کلیه همکارانی که در این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می نماید.

به طور کلی در ترکیب پرتوهای یونساز و هیپرترمی، میزان آسیبهای کروموزومی افزایش می یابد و از آنجا که رابطه مستقیمی بین میزان این آسیبها و مرگ سلولی وجود دارد، می توان افزایش مرگ سلولی را در ارتباط با میزان آسیبهای کروموزومی دانست. لذا به نظر می رسد هیپرترمی سبب شده است تا سیستمهای ترمیم DNA نتوانند به طور مطلوب وظیفه خود را انجام دهند (۳).

Obe و Weissenborn هم در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که ترمیم آسیبهای ناشی از تابش، در فاصله زمانی بین تابش و هیپرترمی به صورت کامل انجام نمی شود که این ناشی از اثر هیپرترمی است (۱۶). Roti و Warters نیز در سال ۱۹۸۱ نشان دادند که

منابع:

- ۱- هال اریک جان. رادیوبیولوژی برای رادیولوژیست، ترجمه: مزدارانی حسین. چاپ اول؛ انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، ۳۹-۴۰۷، ۱۳۶۹.
- 2- Cai Lu.; Jiang Jie. Mild hyperthermia can induce adaptation to cytogenetic, damage caused by subsequent X-irradiation. Radiat Res, 143: 26-33, 1995.
- 3- Dewey WC.; Freeman ML. Cell biology of Hyperthermia and Radiation. Int J Radiat Biol. (Meyn R.E. Withers H. R. Eds.), Raven press, New York: 589-620, 1980.
- 4- Dikomey E. Effect of hyperthermia at 42 and 45 °C on repair of radiation-induced DNA strand breaks in CHO cells. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 41(6): 603-14, 1982.
- 5- Evans HJ.; Maureen LO. Riordan: Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. Mut Res, 3(1): 35-48, 1975.
- 6- International. Atomic Energy Agency: Biological Dosimetry: Chromosomal aberration analysis for dose assessment. Technical Reports Series, Vienna, 260: 28-37, 1986.
- 7- Maurizot SM.; Charlier M.; Sabatier R. DNA radiolysis by fast neutrons. Int J Radiat Biol, 57(2): 304-13, 1990.
- 8- Mitchel RE.; Birnboim HC. Triggering of DNA strand breaks by 45 °C, hyperthermia and its influence on the repair of gamma-radiation damage in human white blood cells. Cancer Res, 45(5): 2040-5, 1985.
- 9- Mittler S. Hyperthermia increases chromosome breakage and loss induced by fission neutrons in Drosophila melanogaster. Mut Res, 139(3): 119-21, 1984.
- 10- Nevaldine B.; Longo JA.; Hahn PJ. Hyperthermia inhibits the repair of DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation as determined by pulsed-field gel electrophoresis. Int J Hyperthermia, 10(3): 381-8, 1994.
- 11- Overgaard J.; Grau C.; Lindegaard JC.; Horsman MR.; et al. The potential of using hyperthermia to eliminate radioresistant hypoxic cells. Radiother Oncol, 20 (Suppl 1): 113-16, 1991.

- 12- Raaphorst GP. Fundamental aspects of hyperthermic biology. In: An introduction to the practical aspects of clinical hyperthermia. Tylor and Francis, 90-8, 1990.
- 13- Raaphorst GP.; Mao JP.; Ng CE. Sublethal radiation damage repair and its inhibition by hyperthermia in two human melanoma cell lines of different radiosensitivities. *Melanoma Res*, 4(3): 157-61, 1994.
- 14- Szeinfeld D.; Villiers N.; Wynchank S. Modification of the effects of Hyperthermia and Neutron radiation on the activity of acid phosphatase in CaNT tumors. *Cancer Biochem Biophys*, 12(4): 253-61, 1992.
- 15- Warters RL.; Roti JL. The effect of hyperthermia on replicating chromatin. *Radiat Res*, 88: 69-78, 1981.
- 16- Weissenborn U.; Obe G. Modification of X-ray induced chromosome aberration frequency by pre-and post irradiation hyperthermia of human peripheral lymphocytes. *Int J Radiat Biol*, 59(4): 973-84, 1991.
- 17- Weissenborn U.; Obe G. Modification of bleomycin-induced chromosome aberrations by hyperthermia and under energy depleting conditions in human peripheral lymphocytes. *Int J Radiat Biol*, 62(3): 289-96, 1992.